



A14

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/48, A61K 31/7088, 48/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/31271</p> <p>(43) 国際公開日 2000年6月2日(02.06.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06534</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月24日(24.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/332760 1998年11月24日(24.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.)[JP/JP] 〒841-0017 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地 Saga, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 飯島 修(IIJIMA, Osamu)[JP/JP] 後藤 武(GOTO, Takashi)[JP/JP] 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 久光製薬株式会社 筑波研究所内 Ibaraki, (JP) 島田 隆(SHIMADA, Takashi)[JP/JP] 〒113-0023 東京都文京区向丘1-20-6-801 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 村山みどり, 外(MURAYAMA, Midori et al.) 〒150-0013 東京都渋谷区恵比寿4丁目20番2号 恵比寿ガーデンテラス武番館709 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: HIV INFECTION INHIBITORS</p> <p>(54)発明の名称 HIV感染阻害剤</p> <p>(57) Abstract An antisense oligonucleotide characterized by being hybridizable specifically with chromosomal DNA and/or RNA encoding CXCR4 protein to thereby inhibit the expression of the CXCR4 protein; and HIV infection inhibitors containing this antisense oligonucleotide.</p>		

(57)要約

CXCR4 蛋白をコードする染色体DNAおよび／またはRNAと特異的にハイブリダイズして、CXCR4 蛋白の発現を阻害することを特徴とするアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびこのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むHIV感染阻害剤が開示されている。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## H I V 感染阻害剤

## 5 技術分野

本発明は、C X C R 4 蛋白をコードする染色体DNAおよび／またはRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとそれを含むH I V 感染阻害剤に関するものである。さらに詳しく言うと、本発明は、エイズ感染に関与する細胞側のレセプターであるC X C R 4 蛋白の染色体DNAおよび／またはRNAと特異的にハイブリダイズして、その発現を抑制することにより、H I V 感染を阻害し得るアンチセンスオリゴヌクレオチドとそれを含むH I V 感染阻害剤に関するものである。

## 背景技術

15 エイズはヒト免疫不全ウイルス（H I V）感染によって引き起こされ、細胞性免疫が著しい障害を受ける結果、種々の日和見感染、リンパ腫、神経障害等を発症して最終的には確実に死に至る疾患である。

現在の治療法としてはアジドチミジン（A Z T）、ジデオキシイノシン（d d I）、ジデオキシシチジン（d d C）等の逆転写酵素阻害剤とサクシナビル、リトナビル、インディナビル等のプロテアーゼ阻害剤の単独、もしくは併用療法が報告されている（H a m m e r, S. M. e t a l., N e w E n g l. J. M e d., 3 3 5, 1 0 8 1 - 1 0 9 0, 1 9 9 6）。ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤は、H I V が細胞に侵入した後、ウイルス自身の持つ逆転写酵素がウイルスの遺伝情報をRNAからDNAに変換する段階に作用して、ウイルスの染色体への組み込みを阻止するものである。しかし、これら逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤は、長期

投与によって容易に耐性ウイルスが出現し、薬剤が無効となる例がある  
(Shirasaka, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2398-2402, 1995; Condra, J. H.  
et al., Nature, 374, 569-571, 1995)。さらに、  
5 細胞側のDNA代謝にも異常を引き起こすため、長期投与による貧血、白血球減少、悪心、頭痛、倦怠感、昏迷や筋炎などの副作用も数多く報告されており、新しい治療法の開発が強く望まれている。

HIVの主な標的細胞は、CD4陽性T細胞とマクロファージである。  
HIVは大きく分けて、CD4陽性T細胞に感染するがマクロファージに  
10 は感染しない株(T細胞指向性HIV)、マクロファージに感染するがCD4陽性T細胞には感染しない株(マクロファージ指向性HIV)、およびいずれの細胞にも感染できる株(両指向性HIV)の3種類に分類される。以前よりHIVの細胞側のレセプターとしてCD4が知られているが、  
このHIVのT細胞指向性に関与する第2のレセプター(セカンドレセプター)  
15 ター)が1996年に同定され、CXCR4と命名された(Feng, Y., et al., Science, 272, 872-877 (1996))。また、同時期にマクロファージ指向性HIVのセカンドレセプターとしてCCR5が同定された(Alkhatib, G. et al., Science, 272, 1955-1958, 1996)。これらセカンドレセプターは、  
20 CD4と共にHIVが感染するために必須の細胞側因子であるが、本来は生体内で分泌されるケモカインに対する受容体であり、CXCR4のリガンドはSDF1、CCR5のリガンドはMIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、およびRANTESであることも明らかにされている。

HIV感染症に対する治療法に関しては、これまで多くの報告があるが、  
25 HIVのゲノム遺伝子の変異は哺乳動物由来の細胞のゲノム遺伝子に比べて非常に高い確率で起こるために、HIVに対して特異的に作用する薬物を考案しても変異したHIVには作用できなくなってしまうという欠

点があった。このようなH I V側の因子を対象とした研究の方向性に対して、H I Vの感染に関わる細胞側の因子を制御することでH I V感染症の治療を行なおうとする試みがなされるようになってきた。この方法は、細胞のゲノム遺伝子に変異を起こしにくいため、逆転写酵素阻害剤にみられるような耐性ウイルスが出現して薬剤が無効となる可能性が少ない。また、従来の抗H I V薬は細胞に感染後のウイルス自身に作用するものであったのに対し、この方法はH I Vの感染段階を阻害するため、細胞自身にH I Vの侵入がなく、細胞の生存率およびその機能を損なう可能性が少ない。

近年、これらセカンドレセプターに着目したH I V感染症治療の基礎的  
10 検討も数多く報告されるようになってきた。例えば、S D F 1、M I P -  
1  $\alpha$ 、M I P - 1  $\beta$ およびR A N T E Sは、レセプターを競合することによる拮抗阻害の様式で、それぞれT細胞指向性H I Vおよびマクロファージ指向性H I Vの感染を阻害すること (B l e u l, C. C., e t a l.,  
N a t u r e, 8 2 9 - 8 3 3, 1 9 9 6; C o c c h i, F., e t a l.,  
15 S c i e n c e, 2 7 0, 1 8 1 1 - 1 8 1 5, 1 9 9 5)、そのアンタゴ  
ニストがH I Vの感染を阻害することや、標的細胞内でケモカインを過剰  
発現させることで、細胞表面にレセプターを発現させない方法等が考えら  
れている (C h e n, J. D., e t a l., N a t u r e M e d i c i n e,  
3, 1 1 1 0 - 1 1 1 6, 1 9 9 7)。しかし、ケモカインの大量投与は、  
20 H I V感染細胞を刺激する結果、大量のH I Vを放出する可能性があり  
(S c h m i d t m a y e r o v a, H., e t a l., N a t u r e, 3 8  
2, 7 6 7, 1 9 9 6)、実際に治療に応用しようとする場合には効果に疑問がある。

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、H I Vに感染する際  
25 の標的細胞のC X C R 4蛋白の発現を抑制することにより、H I V感染を  
阻害し、エイズ感染を予防、治療することができるアンチセンスオリゴ  
ヌクレオチドおよびそれを含むH I V感染阻害剤を提供することを目的と

する。

#### 発明の開示

本発明者らは、上述の課題を解決するために鋭意研究した結果、C X  
5 C R 4 蛋白の発現を特異的に抑制し、H I V の細胞への感染を阻害するアンチセンス遺伝子配列を見い出すことに成功し、本発明を完成した。

すなわち、本発明者らは、C X C R 4 蛋白の発現を特異的に抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドとして、C X C R 4 蛋白をコードする遺伝子を標的遺伝子とし、コーディング領域、G キャップ領域、開始コドン領域等がハイブリダイズする可能性が高いこと (T a k e u c h i , K . , e  
10 t a l . , E x p e r i m e n t a l M e d i c i n e , 5 7 3 - 5 8 3 , 1 9 9 6 ) を考え合わせた上で検討を重ね、C X C R 4 の開始コドン領域を選択し、本発明の完成に至った。

したがって、本発明は、C X C R 4 蛋白をコードする染色体DNAおよび/またはRNAと特異的にハイブリダイズして、C X C R 4 蛋白の発現  
15 を阻害する、下記 (A) から (C) のいずれか1以上の配列を含むことを特徴とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

(A) 配列表の配列番号1に記載の配列

(B) 配列表の配列番号2に記載の配列

20 (C) 配列表の配列番号3に記載の配列

本発明はさらに、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むH I V 感染阻害剤である。

#### 図面の簡単な説明

25 図1は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドのC X C R 4 蛋白発現抑制効果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CXCR4 蛋白をコード  
5 する染色体DNAおよび／またはRNAの一部の塩基配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドである。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CXCR4 蛋白をコード  
するmRNAの遺伝子転写開始点を+1とした場合、+61から+96ま  
10 での開始コドン領域を含む塩基配列に対して相補性を有するとともに、該配列と安定に特異的にハイブリダイズして蛋白への翻訳を遮断する結果、CXCR4 蛋白の生合成を抑制する作用を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列表の配列番号1～3  
に記載の配列のいずれか1以上を含むものであり、配列番号1を含むもの  
15 であることがより好ましい。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1を含み、かつ、開始コドンを配列の中央に含むものであることが特に好ましい。配列番号1～3に記載の配列は、CXCR4 蛋白遺伝子のアンチセンスDNA鎖を示しており、配列番号1は、配列番号  
5 (Nomura, H., et al., Int. Immunol., 5, 1239  
20 -1249, 1993) に記載のCXCR4 蛋白のcDNAの塩基配列の+67から+90に、配列番号2は同じく配列番号5の+73から+96に、配列番号3は同じく配列番号5の+61から+83に、それぞれ対応している。また、配列番号1は、CXCR4 蛋白遺伝子の開始コドンをアンチセンスDNA鎖の中央に、配列番号2は同じくCXCR4 蛋白遺伝子の  
25 の開始コドンをアンチセンスDNA鎖の3'側に、配列番号3は同じくCXCR4 蛋白遺伝子の開始コドンをアンチセンスDNA鎖の5'側に、それぞれ含む。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの長さの上限は、DNA/RNA合成機での遺伝子合成効率が塩基数の増加と共に低下することや、合成コストの問題から、好ましくは100塩基以下であり、より好ましくは30塩基以下である。また、遺伝子の長さの下限は、アンチセンスオリゴ  
5 ヌクレオチドの特異性を保持させるために、好ましくは8塩基以上であり、より好ましくは12塩基以上であり、特に好ましくは15塩基以上である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成の方法は特に限定されず、例えば、通常のオリゴヌクレオチド合成機を用いたホスホロアミダ  
10 イド法により、ホスホロチオエート型やホスホトリエステルのオリゴヌクレオチドを得ることができる。このような合成方法により得られるアンチセンスオリゴヌクレオチドの例としては、ホスホジエステル型のオリゴヌクレオチド、生体に投与した場合のヌクレアーゼによる分解を防ぐためにリン酸基がイオウ原子により共有結合で修飾されたホスホロチオエ  
15 ト型のオリゴヌクレオチド、リン酸骨格をメチル化したメチルホスホネート型オリゴヌクレオチド、リン酸骨格の代わりにモルホリンが導入されたモルホリン骨格オリゴヌクレオチド、膜透過性を高める目的で脂溶性物質のゲラニオールで修飾したオリゴヌクレオチド等を挙げることができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、HIV感染阻害剤として用いることができる。この場合、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチ  
20 ドを単独で用いることもできるが、目的細胞に確実に導入し、生体内における分解を防ぐために、薬学的に許容される担体と組み合わせた組成物として使用することが可能である。担体は薬学的に許容される物質であれば特に限定されないが、例えば、正電荷を有する高分子、リポソーム、マイクロスフィア等を好適に用いることができる。

25 正電荷を有する高分子としては、TfX-50 (-10、-20) (プロメガ社製)、トランスフェクタム (和光純薬工業社製)、ExGen 500 (和光純薬工業社製)、合成ポリアミノ酸またはその誘導体、具体的



には、WO 95/09009号公報に記載のポリーリジン：セリン（PLS）、特開平9-176038号に記載のPLSのPEGブロック修飾体等を挙げることができる。

リポソームとしては、リポフェクチン（GIBCO社製）、リポフェク  
5 トアミン（GIBCO社製）、セルフェクチン（GIBCO社製）、DM  
RIE-C（GIBCO社製）等を挙げることができる。マイクロスフィ  
アとしては、スーパーフェクト（QIAGEN社製）等を挙げることがで  
きる。これらの薬学的に許容される担体と本発明のアンチセンスオリゴヌ  
クレオチドは、公知の方法により複合体を形成することができる。

10 尚、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびHIV感染阻害剤  
の使用方法は特に限定はされないが、*in vivo*、*in vitro*、  
*ex vivo* 等いずれも使用可能である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、遺伝子発現をプロモーシ  
ョンする遺伝子配列を含む遺伝子発現ベクターに挿入することにより、遺  
15 伝子治療用アンチセンスRNA発現構築物として使用することもできる。  
遺伝子発現ベクターとしては、プラスミド、組み換えウイルス等を使用す  
ることができる。

プラスミドを遺伝子発現ベクターとして選択した場合は、プラスミド単  
独で用いることもできるが、ヌクレアーゼによる分解の防止および遺伝子  
20 発現効率の向上のためには、薬学的に許容される担体との複合体を形成し  
た組成物として使用することが好ましい。また、組み換えウイルスは、哺  
乳動物由来の細胞、好ましくはヒト由来の細胞に感染可能であれば特に制  
限なく使用することが可能であり、マウス白血病ウイルス、アデノウイル  
ス、アデノ関連ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、シンドビスウイルス、  
25 ヘルペスウイルス、センダイウイルス、エプスタインバーウイルスより選  
択することができ、これらの中でもマウス白血病ウイルス、アデノウイル  
ス、アデノ関連ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスは好ましく、ヒト免疫不

全ウイルスは特に好ましい。アンチセンスRNA発現遺伝子構築物の使用方法は特に限定されず、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*等いずれも使用可能である。

#### 実施例

- 5      以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明の理解を助けるためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 実施例 1

(アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成及び精製)

- 10      配列表の配列番号 1 ～ 3 のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび配列番号 4 の DNA 鎖は、DNA 合成機を用い、ホスホアミダイド法によりホスホロチオエート型を合成し、さらにイオン交換 FPLC を用い、公知の条件により精製した (Amersham Pharmacia Biotech 社に依託)。
- 15      配列番号 1 ～ 3 は、CXCR4 蛋白遺伝子のアンチセンス DNA 鎖であり、配列番号 1 は配列番号 5 の + 6 7 から + 9 0 に、配列番号 2 は配列番号 5 の + 7 3 から + 9 6 に、配列番号 3 は配列番号 5 の + 6 1 から + 8 3 にそれぞれ対応する。

- 配列番号 5 は、CXCR4 蛋白の cDNA の塩基配列 (Nomura, H., et al., Int. Immunol., 5, 1239-1249, 1993) を示す。
- 20

- また、配列番号 4 は、配列番号 1 ～ 3 の配列の長さとはほぼ同一の 24 塩基であり、A、C、G、T の含有率が配列番号 1 と同一になるように、配列番号 1 の配列をシャッフルさせた陰性対象群の合成 DNA 鎖である (比較例)。
- 25

#### 実施例 2

(アンチセンスオリゴヌクレオチドと遺伝子導入試薬との複合体 (HIV

感染阻害剤)の調製)

遺伝子導入製剤(薬学的に許容される担体)としてGIBCO社製のDMRIE-C試薬を用いた。500 $\mu$ lのOpti-MEM培地(GIBCO社製)に、配列番号1~3のアンチセンスオリゴヌクレオチドをそれぞれ2 $\mu$ Mとなるように調製し、A液とした。また、500 $\mu$ lのOpti-MEM培地に、DMRIE-C試薬を20 $\mu$ g/mlとなるように調製し、B液とした。A液にB液を加え、緩やかに振盪した後、30分間室温で放置することにより、アンチセンスオリゴヌクレオチド/DMRIE-C複合体を得た。また、比較例として、配列番号4のDNA鎖を用い、  
10 同様の複合体を得た。

#### 試験例1

(CXCR4蛋白発現抑制効果試験)

(A) 培養細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入

配列番号1~3のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび、配列番号4のDNA鎖のCXCR4蛋白発現抑制効果を、培養細胞系において検討した。  
15

細胞は内因性のCXCR4蛋白を恒常的に発現し、CD4蛋白を恒常的に発現するようにCD4蛋白をコードする遺伝子を組み込んだHeLa細胞を用いた(以下、CD4HeLa細胞と言う)。CD4HeLa細胞を、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で10%牛胎児血清(FCS:GIBCO社製)および抗生物質を添加したダルベッコ改良イーグル培地(DMEM:GIBCO社製)中において維持した。  
20

このCD4HeLa細胞を、6ウェルプレートに5 $\times$ 10<sup>5</sup>個/ウェルとなるように播種し、1晩培養した後、細胞をOpti-MEMで2回洗浄し、実施例2で調製したアンチセンスオリゴヌクレオチド/DMRIE-C複合体を1ml添加した。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で4時間培養した後、10%FCSを含む5mlのDMEMを加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO  
25

2の条件下でさらに培養した。

(B) CXCR4 蛋白の蛍光抗体法による検出

上記 (A) においてアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した細胞を、  
24 時間後に採取し、CXCR4 に対するモノクローナル抗体 (PHAR  
5 MINGEN 社製) で処理した後、FITC 標識した 2 次抗体 (Jack  
son ImmunoResearch 社製) で染色した。染色した細胞  
を、FACS Calibur フローサイトメーター (Becton Di  
ckinson 社製) を用いて CXCR4 陽性細胞の比率を解析した。結  
果を図 1 に示す。

- 10 アンチセンスオリゴヌクレオチド非投与群および配列番号 4 (比較例)  
では、24 時間の培養期間において CXCR4 陽性細胞の比率に変化がな  
かったが、配列番号 1 ~ 3 のアンチセンスオリゴヌクレオチド投与群では、  
24 時間の培養期間において CXCR4 陽性細胞の比率が著しく減少し  
た。特に、翻訳開始コドンアンチセンス DNA 鎖の中央を含む、配列番  
15 号 1 のアンチセンスオリゴヌクレオチドが最も CXCR4 陽性細胞の比  
率を減少させた。この結果から、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチ  
ドは、CXCR4 蛋白の発現抑制効果が非常に優れていることが判明した。

産業上の利用可能性

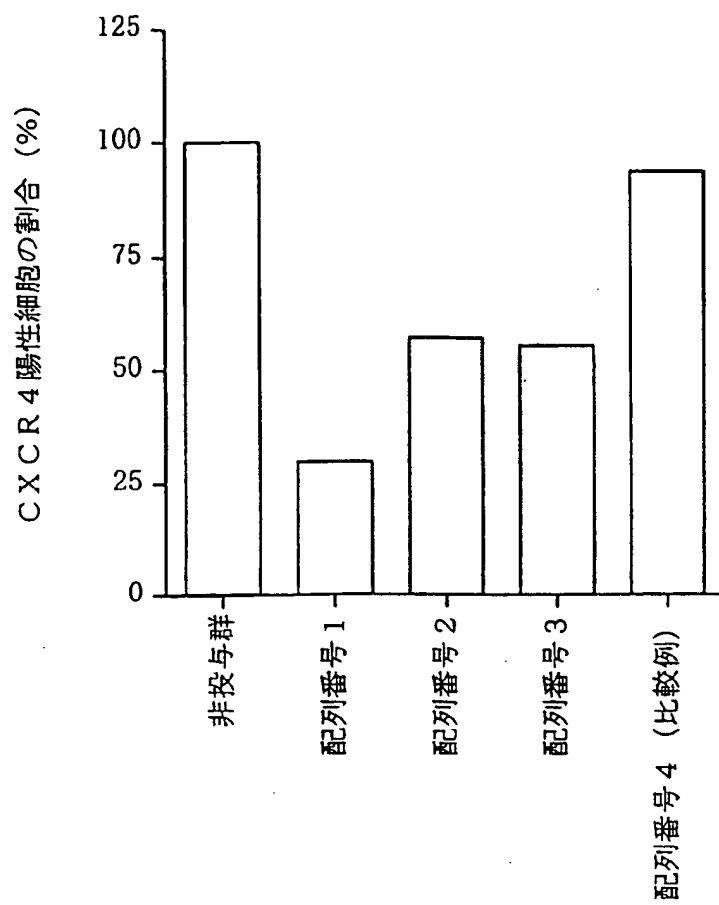
- 20 以上説明した通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CX  
CR4 蛋白の発現を抑制し、HIV の感染を阻害することができる。従っ  
て、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびそれを含む HIV 感  
染抑制剤は、HIV 感染の予防及び治療薬として非常に有効である。

## 請 求 の 範 囲

1. C X C R 4 蛋白をコードする染色体DNAおよび／またはRNAと特異的にハイブリダイズし、C X C R 4 蛋白の発現を阻害する、下記(A)から(C)のいずれか1以上の配列を含むことを特徴とするアンチセンスオリゴヌクレオチド。
    - (A) 配列表の配列番号1に記載の配列
    - (B) 配列表の配列番号2に記載の配列
    - (C) 配列表の配列番号3に記載の配列
  2. 請求の範囲第1項記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む
- 10 HIV感染阻害剤。

1 / 1

図 1



1/4

(配列表)

配列番号 : 1

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 配列番号5の+67から+90に対応

10 配列

CTGATCCCCTCCATGGTAACCGCT

配列番号 : 2

配列の長さ : 24

15 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

アンチセンス : YES

20 配列の特徴 : 配列番号5の+73から+96に対応

配列

TATATACTGATCCCCTCCATGGTA

配列番号 : 3

25 配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

2/4

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

アンチセンス：YES

- 5 配列の特徴：配列番号5の+61から+83に対応

配列

CCTCCATGGTAACCGCTGGTTCT

配列番号：4

- 10 配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

- 15 アンチセンス：NO

配列の特徴：配列番号1の配列をシャッフルした合成DNA

配列

AACTCCCTTGGTGCTCCTACACGC

- 20 配列番号：5

配列の長さ：1664

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

- 25 配列の種類：cDNA

アンチセンス：NO



3/4

配列の特徴 : CXCR4のcDNA

配列

	CGGCAGCAGG	TAGCAAAGTG	ACGCCGAGGG	CCTGAGTGCT	40
	CCAGTAGCCA	CCGCATCTGG	AGAACCAGCG	GTTACCATGG	80
5	AGGGGATCAG	TATATACACT	TCAGATAACT	ACACCGAGGA	120
	AATGGGCTCA	GGGGACTATG	ACTCCATGAA	GGAACCCTGT	160
	TTCCGTGAAG	AAAATGCTAA	TTTCAATAAA	ATCTTCCTGC	200
	CCACCATCTA	CTCCATCATC	TTCTTAACTG	GCATTGTGGG	240
	CAATGGATTG	GTCATCCTGG	TCATGGGTTA	CCAGAAGAAA	280
10	CTGAGAAGCA	TGACGGACAA	GTACAGGCTG	CACCTGTCAG	320
	TGGCCGACCT	CCTCTTTGTC	ATCACGCTTC	CCTTCTGGGC	360
	AGTTGATGCC	GTGGCAAAC	GGTACTTTGG	GAACCTCCTA	400
	TGCAAGGCAG	TCCATGTTCAT	CTACACAGTC	AACCTCTACA	440
	GCAGTGTCCT	CATCCTGGCC	TTCATCAGTC	TGGACCGCTA	480
15	CCTGGCCATC	GTCCACGCCA	CCAACAGTCA	GAGGCCAAGG	520
	AAGCTGTTGG	CTGAAAAGGT	GGTCTATGTT	GGCGTCTGGA	560
	TCCCTGCCCT	CCTGCTGACT	ATTCCCGACT	TCATCTTTGC	600
	CAACGTCAGT	GAGGCAGATG	ACAGATATAT	CTGTGACCGC	640
	TTCTACCCCA	ATGACTTGTG	GGTGGTTGTG	TTCCAGTTTC	680
20	AGCACATCAT	GGTTGGCCTT	ATCCTGCCTG	GTATTGTCAT	720
	CCTGTCCTGC	TATTGCATTA	TCATCTCCAA	GCTGTCACAC	760
	TCCAAGGGCC	ACCAGAAGCG	CAAGGCCCTC	AAGACCACAG	800
	TCATCCTCAT	CCTGGCTTTC	TTCGCCTGTT	GGCTGCCTTA	840
	CTACATTGGG	ATCAGCATCG	ACTCCTTCAT	CCTCCTGGAA	880
25	ATCATCAAGC	AAGGGTGTGA	GTTTGAGAAC	ACTGTGCACA	920
	AGTGGATTTC	CATCACCGAG	GCCCTAGCTT	TCTTCCACTG	960

4/4

TTGTCTGAAC CCCATCCTCT ATGCTTTCCT TGGAGCCAAA 1000  
TTTAAACCT CTGCCCAGCA CGCACTCACC TCTGTGAGCA 1040  
GAGGGTCCAG CCTCAAGATC CTCTCCAAAG GAAAGCGAGG 1080  
TGGACATTCA TCTGTTTCCA CTGAGTCTGA GTCTTCAAGT 1120  
5 TTTCACTCCA GCTAACACAG ATGTAAAAGA CTTTTTTTTTA 1160  
TACGATAAAT AACTTTTTTT TAAGTTACAC ATTTTTCAGA 1200  
TATAAAAGAC TGACCAATAT TGTACAGTTT TTATTGCTTG 1240  
TTGGATTTTT GTCTTGTGTT TCTTTAGTTT TTGTGAAGTT 1280  
TAATTGACTT ATTTATATAA ATTTTTTTTG TTTCATATTG 1320  
10 ATGTGTGTCT AGGCAGGACC TGTGGCCAAG TTCTTAGTTG 1360  
CTGTATGTCT CGTGGTAGGA CTGTAGAAAA GGGAACTGAA 1400  
CATTCCAGAG CGTGTAGTTA ATCACGTAAA GCTAGAAATG 1440  
ATCCCCAGCT GTTTATGCAT AGATAATCTC TCCATTCCCG 1480  
TGGAACGTTT TTCCTGTTCT TAAGACGTGA TTTTGCTGTA 1520  
15 GAAGATGGCA CTTATAACCA AAGCCCAAAG TGGTATAGAA 1560  
ATGCTGGTTT TTCAGTTTTT AGGAGTGGGT TGATTTTCAGC 1600  
ACCTACAGTG TACAGTCTTG TATTAAGTTG TTAATAAAAG 1640  
TACATGTAA ACTTAAAAAA AAAA 1664

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06534

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/48, A61K 31/7088, A61K 48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/48, A61K 31/7088, A61K 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN),  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	N.Suzuki et al., "Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 infection by a recombinant HIV vector expressing antisense-CXCR4", Journal of the American Society of Hematology (1998), Vol.92, No.10, Suppl.1, p.386b	1, 2
Y	Hideki Homura et al., "Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors", International Immunology (1993), Vol.5, No.10, p.1239-1249	1, 2
PX	Akiko Kusunoki et al., "Antisense oligodeoxynucleotide complementary to CXCR4 mRNA block replication of HIV-1 in cos cells", Nucleosides & Nucleotides (June, July 1999), Vol.18, No.6/7, p.1705-1708	1, 2
PX	WO, 99/51751, A1 (YAMANOUCHI PHARM CO.LTD.), 14 October, 1999 (14.10.99) & JP, 11-292795, A	1, 2
PX	JP, 11-285391, A (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.), 19 October, 1999 (19.10.99) (Family: none)	1, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 February, 2000 (18.02.00)

Date of mailing of the international search report  
29 February, 2000 (29.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/06534

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/48, A61K 31/7088, A61K 48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/48, A61K 31/7088, A61K 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), MEDLINE(STN), REGISTRY(STN),  
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	N. Suzuki et al., "Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 infection by a recombinant HIV vector expressing antisense-CXCR4", Journal of the American Society of Hematology (1998), Vol. 92, No. 10, Suppl. 1, p. 386b	1, 2
Y	Hideki Homura et al., "Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors", International Immunology (1993), Vol. 5, No. 10, p. 1239-1249	1, 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.02.00

国際調査報告の発送日

29.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Akiko Kusunoki et al., "Antisense oligodeoxynucleotide complementary to CXCR4 mRNA block replication of HIV-1 in cos cells", Nucleosides & Nucleotides (June, July 1999), Vol. 18, No. 6/7, p. 1705-1708	1, 2
P X	WO, 99/51751, A1 (YAMANOUCHI PHARM CO. LTD.) 14. 10月. 1999 (14. 10. 99) & JP, 11-292795, A	1, 2
P X	JP, 11-285391, A (久光製薬株式会社) 19. 10月. 1999 (19. 10. 99) ファミリーなし	1, 2